



A DOCPHOENIX

【特許請求の範囲】

1. 支持体上に被検体アッセイ領域から成るマイクロ配列を形成する方法であって、マイクロ配列の各領域は既知量の選択された被検体特異試薬を有する配列を形成する方法であって、

(a) 選択された被検体特異試薬を含む溶液を(i)違いに離れて同一方向に広がる細長い部材によって形成され、(ii)一定量の試薬溶液を保持することができ、(iii)前記毛管流路中の水溶液がメニスカスを形成する先端領域を有する、細長い毛管流路を有する試薬分配装置に充填するステップと、

(b) 前記分配装置の先端を表面上の規定位置で支持体に対して軽く打ち付け、毛管流路中のメニスカスを壊すように衝撃を与え、選択された量の溶液を表面上に付着させるステップと、

(c) ステップ(a)、(b)を前記配列が形成されるまで繰り返すステップと

を備えるマイクロ配列形成方法。

2. 前記打ち付けは、0.01nlないし100nlの範囲で選択された容量を付着させるために効果的な衝撃を与えて行うことを特徴とする請求の範囲第1項記載のマイクロ配列形成方法。

3. 前記流路は、一対の離れたテーパ要素によって形成されることを特徴とする請求の範囲第1項記載のマイクロ配列形成方法。

4. 上記のような複数の配列を形成するために、ステップ(b)を、ステップ(c)を進行する各反復サイクル時に、複数の支持体各々の上に選択された位置で行うことを特徴とする請求の範囲第1項記載のマイクロ配列形成方法。

5. ステップ(a)および(b)を少なくとも一回実施した後に、試薬分配装置に新たな試薬溶液を、(i)試薬分配装置の毛管流路を洗浄溶液に浸すステップと(ii)毛管流路に流れ込んだ洗浄溶液を除去するステップと、(iii)毛管流路に新たな試薬溶液を浸すステップと、によって再充填するステップをさらに含むことを特徴とする請求の範囲第1項記載のマイクロ配列形成方法。

6. 複数の支持体上に被検体アッセイ領域から成るマイクロ配列を形成する自動

装置であって、マイクロ配列の各領域は既知量の選択された被検体特異試薬を有する自動装置であって、

- (a) 所定の位置に複数の平面支持体を保持するホルダーと、
 - (b) (i)互いに離れて同一方向に広がる細長い部材によって形成され、(ii)一定量の試薬溶液を保持することができ、(iii)流路の水溶液がメニスカスを形成する先端領域を有する、開口毛管流路を有する試薬分配装置と、
 - (c) 分配装置を前記ホルダーの支持体に対して選択された配列位置に位置決めする位置決め手段と、
 - (d) 分配装置を支持体に対して規定の配列位置に位置決めしたときに、分配装置を選択された衝撃で支持体に打ち付ける位置まで移動し、毛管流路の液体によって生じるメニスカスを壊す衝撃を与え、選択された量の溶液を表面に付着させる付着手段と、
 - (e) 前記位置決め手段と前記付着手段とを制御するための制御手段と、
- を備える自動装置。

7. 前記付着手段は、前記分配装置を支持体に対して効果的に移動させ、効果的な衝撃を与えて、0.01ないし100nlの範囲で選択された量を付着させることを特徴とする請求の範囲第6項記載の自動装置。

8. 前記流路は、一对の互いに距離をあけたテーパ要素によって形成されることを特徴とする請求の範囲第6項記載の自動装置。

9. 前記制御手段は、(i)分配装置を充填位置に配置し、(ii)分配装置の毛管流路を選択された試薬に充填位置で浸して、分配装置に試薬を充填し、(iii)試薬を前記ホルダー上の各支持体上の規定の配列位置で分配するように動作することを特徴とする請求の範囲第6項記載の自動装置。

10. 前記制御装置は、分配サイクルの最後に、(i)分配装置を洗浄位置に配置し、(ii)毛管流路を洗浄液に移動させてこれに浸し、分配装置に洗浄液を充填し、(iii)分配装置に新鮮な選択された液を充填する前に、洗浄液を除去することによって、分配装置を洗浄するようさらに動作することを特徴とする請求の範囲第6項記載の自動装置。

1 1. 前記分配装置は、異なる被検体アッセイ試薬を選択された互いに離れた位置に配分するためのアームに備えられる複数の装置の1つであることを特徴とする請求の範囲第6項記載の自動装置。

1 2. 1cm^2 あたり少なくとも 10^3 個の異なるポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド生体重合体から成るマイクロ配列を含む表面を有し、各異なる生体重合体試料は、(i)前記マイクロ配列の個別の規定の位置に付着され、(ii)少なくともサブユニット50個分の長さがあり、(iii)約0.1フェトモルから100ナノモルまでの規定量で存在することを特徴とする基板。

1 3. 前記表面は、ポリリシンで被覆されたスライドガラスであり、前記生体重合体はポリヌクレオチドであることを特徴とする請求の範囲第12項記載の基板。

1 4. 前記基板は、非透水性の裏地と、透水性で裏地に形成されたフィルムと、フィルムで形成された格子とを有し、前記格子は(i)前記裏地から前記フィルムの表面の上の高くした位置まで延在し交差する非透水性格子要素から成り、(ii)フィルムを複数の非透水性セルにしきられ、各セルは上記のような生体重合体配列を収容することを特徴とする請求の範囲第12項記載の基板。

1 5. 試料を収容するセルから成る表面配列を有する基板であって、
非透水性裏地と、

裏地に形成された透水性フィルムと、

前記フィルム上に形成された格子とを有し、

前記裏地から前記フィルムの表面上の高い位置まで延在し交差する非透水性格子要素から成る前記格子を備える基板。

1 6. ミクロ配列のセルは、生体重合体の配列を含むことを特徴とする請求の範囲第15項記載の基板。

1 7. 標識生体重合体が複数の異なるポリヌクレオチドの1つ以上に結合していることを検出するために使用する基板であって、

非多孔性のガラス基板と、

前記基板上のカチオンポリマーから成る被覆と、

前記被覆に対して異なるポリヌクレオチドから成る配列であり、各生体重合体は生体重合体から成る表面配列に個別に規定された位置に分配されることを特徴とする基板。

18. 第1の細胞タイプ中の複数の遺伝子各々の示差的な発現を、第2の細胞タイプ中の同じ遺伝子の発現と比較して検出する方法であって、

蛍光標識cDNAを2つの細胞タイプから単離されたmRNAから生成し、第1の細胞と第2の細胞から得たcDNAを第1および第2の蛍光リポーターで標識するステップと、

2つの細胞タイプから得た標識cDNAの混合物を、2つの細胞タイプに由来する複数の既知の遺伝子を表現するポリヌクレオチドから成る配列に、cDNAを配列中の相補的な配列であるポリヌクレオチドにハイブリダイゼーションさせる条件下で添加するステップと、

(i)第1および第2の細胞タイプの1つに由来するcDNAに優先的にハイブリダイズされる配列中のポリヌクレオチドが、第1または第2の異なる蛍光色をそれぞれ放出、(ii)第1および第2の細胞タイプに由来する実質的に等しい数のcDNAにハイブリダイズされる配列中のポリヌクレオチドが異なる組み合わせの蛍光色をそれぞれ放出する、蛍光励起条件下で蛍光によって配列を試験するステップとを有し、2つの細胞タイプの既知の相対的発現を、各スポットで観察された蛍光色の放出によって測定することができるようにした

ことを備える検出方法。

19. ポリヌクレオチドの配列は、表面積が約 1cm^2 未満に少なくとも 10^2 個の異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチド生体重合体から成る配列を含む表面を有する基板上に形成され、各異なる生体重合体は、(i)前記配列に規定された個別の位置に分配され、(ii)少なくともサブユニット50個分の長さを有し、(iii)約 0.1フェムトモル から 100nm までの規定量で存在することを特徴とする請求の範囲第18項記載の検出方法。

20. 前記表面は、ポリリシンで被覆されたスライドガラスであり、前記生体重合体は前記ポリリシンに非共有的に結合されたポリヌクレオチドであることを特

徴とする請求の範囲第19項記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

生体試料から成るマイクロ配列を作成するための
方法および装置

発明の分野

本発明は、遺伝子研究および分析用途のためのDNAハイブリダイゼーション・アッセイに使われるDNA試料の配列などの、大量スクリーニングアッセイに用いる生体試料から成るマイクロ配列を作成するための方法および装置に関する。

参考文献

- Abouzied, et al., Journal of AOAC International 77(2):449-500(1994).
Bohlander, et al., Genomics 13:1322-1324(1992).
Drmanac, et al., Science 260:1649-1652(1993).
Fodor, et al., Science 251:767-773(1991).
Khrapko, et al., DNA sequence 1:375-388(1991).
Kuriyama, et al., IN ISFET BIOSENSOR, APPLIED BIOSENSORS
(Donald Wise, Ed.), Butterworths pp. 93-114(1989).
Lehrach, et al., HYBRIDIZATION FINGERPRINTING IN GENOME MAPPING AND
SEQUENCING, GENOME ANALYSIS, VOL. 1(Davis and Tilgham, Eds.), Cold
Spring Harbor Press, pp. 39-81(1990)
Maniatis, et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold
spring Harbor Press.
Nelson, et al., Nature Genetics 4:11-18(1993).
Pirrung, et al., U.S. Patent No, 5, 143, 854(1992).
Riles, et al., Genetics 134:81-150(1993).
Schena, M. et al, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:3894-3898(1992).
Southern, et al., Genomics 13:1008-1017(1992)

発明の背景

現在、種々の方法を利用して、核酸分子やタンパク質の配列などの生体分子から成る配列を調製することができる。秩序のあるDNA配列を多孔性膜上に並べる

方法の1つには、「ドットブロット」法がある。この方法では、真空マニホールドによって、96個などの複数のDNAの水性試料を直径3ミリメートルのウェルから多孔性膜に移す。この方法とやや異なる方法に、ウェルを楕円形の長軸方向にかなり延伸させた「スロットブロット」法があることがよく知られている。

DNAは、膜を焼成するか紫外線にさらすことによって多孔性膜に固定される。これは、1回に1つの配列を調製するためには、実用的な手操作による手法であるが、通常1配列あたり96個の試料しか利用できない。従って、「ドットブロット」法は、何千もの試料を測定しなければならない場合に利用するには不十分な方法である。

ゲノム断片の整序された配列を調製するために使われるさらに効率的な技術では、ウェルに、例えば、マイクロタイター板の96ウェルに、配列されたピンを浸し、試料の配列を多孔性膜などの支持体に移動させる。1つの配列には、互い違いに膜にスポットするように配列させたピンを含み、そのピンが22×22cmの広さに9216個のスポットの配列を作り出すことができる (Lehrach et al., 1990)。この方法の限界は、各配列の各ピクセルにスポットされるDNAの量が非常に変わりやすいことである。さらに、各ディッピングによって作られる配列の数は非常に少ないのが普通である。

核酸配列を秩序よく配列する他の方法が、Pirruung et al. (1992) および Fodor et al. (1991) によって示されている。その方法では、種々の核酸の配列を、1つの支持体の異なる領域に離散的に合成するステップを含む。この方法では精巧な合成経路を利用するが、一般に相対的に短い核酸試料、例えば20未満の塩基などにしか使用することができない。これに関連した方法が、Southern et al. (1992) によって示されている。

Khrapko, et al. (1991) は、ポリアクリルアミドの薄層上にDNAをスポットすることによってオリゴヌクレオチド基質を調製する方法を示した。このスポット処理は、マイクロピペットによって手作業で行われる。

従来の技術で説明された方法または装置は、(i) 50-200ミクロン以下の距離だけ離れた多数の微小なアッセイ領域と、(ii) その配列の各領域に対応し一般

にピコモル単位の範囲で示される明確な量の被検体と、によって特徴付けられるマイクロ配列を大量作成することはできなかった。

さらに、現在の技術は、一度に一つの配列のDNA分子に対してこのようなアッセイを行うように意図されている。例えば、DNAハイブリダイゼーションを多孔性膜上にスポットされた配列に行うという最もよく知られる方法は、その多孔性膜を可塑性バッグにシーリングする (Maniatis, et al., 1989)、またはシールされたチャンバー内でラベルされたハイブリダイゼーションプローブとともにガラスシリンダー (Robbins Scientific) を回転させるというステップを含む。顕微鏡用スライドなどの非多孔性膜の表面に調製された配列の場合、各配列はカバーガラス下に密封された標識のついたハイブリダイゼーションプローブを用いてインキュベートされる。これらの技術は、各配列に対して個々の密封されたチャンバーを用意しなければならないため、こうした配列の数が多ければスクリーニングおよび処理に手数と長い時間がかかる。

Abouzied, et al. (1994)は、ニトロセルロース膜上に水平に並んだ抗体を焼き付ける方法と、疎水性材料から成る縦のストライプでその膜の領域を分離する方法について述べている。次に、各縦のストライプを異なる抗原と反応させて、固定した抗体と抗原の反応を標準ELISA比色法を利用して検出する。Abouziedの技術を用いれば、多くの一次元配列を同時に一枚のニトロセルロース上でスクリーニングすることができる。Abouziedは、PAPペンで線を描くことでニトロセルロースを幾分疎水性にした (Research Products International)。ただし、Abouziedは、ニトロセルロースの細孔を完全に密封することができる技術については説明していない。

ニトロセルロースの細孔は、いまだにかなり隙間があり、アッセイ用試薬が長期の高温インキュベーション中または界面活性剤の存在下では、疎水性バリエーを通じて漏れる傾向があるので、Abouziedの技術をDNAハイブリダイゼーションアッセイに利用できなくなる。

親水性試薬 疎水性試薬の焼き付けパターンを有する多孔性膜は、細菌コロニーを秩序よく配列するためになどに用いられる。QA Life Sciences (San Diego

CA) は、このような格子パターンを焼き付けた膜を調製している。しかし、この膜はAbouziedの技術と同じ短所がある。その理由は、試薬が格子状の配列の間を流れてしまい、個々のDNAハイブリダイゼーション・アッセイには利用できなくなるからである。

Pall Corporationは、自己の底面をヒートシールした多孔性フィルターを有する96ウェル板を製造している。この種の板は、相互汚染をおこさないで各ウェルに異なる試薬を含ませることができる。ただし、各ウェルは、一つの標的要素しか保持しないように意図されているが、本書に記載される本発明は、固形の支持体の各分割された領域に多くの生体分子から成るマイクロ配列を調製する。さらに、96ウェル板は、少なくとも1cmの厚さがあるため、膜が検出面に対して平坦に広がらなければならない多くの比色検出用装置、蛍光検出用装置、放射線検出用装置を使用することができない。これに対し、本書に記載された本発明は、アッセイ・ステップの後にさらに処理をする必要はない。この理由は、バリヤー要素は薄く、検出ステップを妨げないからであり、これにより顕著に便宜性が増すこととなる。

Hyseq Corporationは、ハイブリダイゼーション技術によるシーケンシングに使用する為に非多孔性支持体上で「複数の配列から成る配列」を調製する方法について述べている。Hyseqによって記載された方法は、支持体材料の化学的性質を修正し、疎水性格子パターンを形成し、各分割領域が生体分子から成るマイクロ配列を含むようにするステップを含む。Hyseqの平坦な疎水性パターンには、相互汚染を防止する付加的な手段としての物理的遮断を使用しない。

発明の概要

本発明の一態様は、支持体上に被検体アッセイ領域から成るマイクロ配列を形成する方向を含み、この配列の各領域は既知量の選択された被検体特異試薬を有する。この方法では、最初に、選択された被検体特異試薬を含む溶液を、(i)互いに距離を空け同一方向に延在する部材によって形成され(ii)ある量の試薬を保持することができ(iii)先端領域ではその毛管に流れる水溶液がメニスカスを呈する、細長い毛管流路を有する試薬分配装置に充填するステップを含む。この毛管

は、好ましくは一对の互いに距離を空けたテーパー要素によって形成される。

この分配装置の先端を、支持体の表面の指定位置で支持体に対し軽く打ち付け、毛管の中のメニスカスを壊すに十分な衝撃でこれをなし、毛管から選択された量、好ましくは0.01nl-100nlの量の溶液を表面に付着させる。この2つのステップを所望の配列が形成されるまで繰り返す。

本発明に係る方法は、こうした複数の配列を形成する際に実施できるが、この場合、溶液を付着させるステップは各サイクルを繰り返すときに複数の支持体上の選択位置に対して行う。

分配装置は、以下のステップによって新しい溶液が充填される。すなわち、(i)装置の毛管を洗浄液に浸すステップと、(ii)毛管に吸い込まれた洗浄溶液を除去するステップと、(iii)毛管を新しい試薬溶液に浸すステップによってこれを行うことができる。

また、本発明には、被検体アッセイ領域から成るマイクロ配列を複数の支持体上に形成し、配列中の各領域が既知量の選択された被検体特異試薬を有するようにするための自動装置を含む。この装置は、所定の位置で、複数の平面支持体を保持するためのホルダーと、上述したタイプの試薬分配装置と、を有する。

さらに、この装置は分配装置を上述のホルダーの中の支持体に対して選択された配列位置に位置させる位置決め構造と、分配装置を支持体に対して打ち付ける部分まで移動し、選択された衝撃を与えて支持体上に選択された容量で、例えば、

0.01nl-100nlの範囲で付着させる分配構造と、を含む。

これらの位置決め構造と分配構造は、装置内の制御装置によって制御される。この装置は、(i)分配装置を充填場所に配置し、(ii)装置の毛管を充填場所において選択試薬に浸し、分配装置に試薬を充填し、(iii)試薬を上述のホルダー上の各支持体上の規定の配列位置に付着させる、ように動作する。さらに、この装置は、分配サイクルの最後に、(i)分配装置を洗浄位置に配置し、(ii)装置の毛管を洗浄液に浸して、分配装置に液体を充填し、(iii)洗浄液を除去してから、新鮮な選択試薬を分配装置に充填することにより、分配装置を洗浄するように動

作することもできる。

本装置におけるこの分配装置は、異なる被検体アッセイ試薬を選択された互いに間隔のある配列位置に分配するためのアームに装備させた複数のこうした装置の1つであつてもよい。

別の態様では、本発明には、約 1cm^2 未満の表面積に少なくとも 10^3 個の個別のポリヌクレオチド生体重合体またはポリペプチド生体重合体から成るマイクロ配列を有する面を有する基板を含む。各個別の生体重合体は、(i) 上述の配列の別個の所定の位置に付着され、(ii) 少なくとも50個分のサブユニットを繋げた長さがあり、(iii) 約0.1フェムトモルー100ナノモルまでの規定量で存在する。

本発明の一態様では、この表面は、ポリリシンなどのポリカチオンポリマーで被覆されたスライドガラス面であり、生体重合体はポリヌクレオチドである。別の態様では、基板は非透水性の裏地と、その裏地上に形成された透水性フィルムと、フィルム上に形成された格子と、を有する。この格子は、上述の裏地から上述のフィルムの面上の高さまで延在する非透水性格子要素が交差して形成され、フィルムを複数の非透水性セルに分割する。生体重合体配列は、各ウェル内に形成される。

より一般的には、標識されたポリヌクレオチドが複数の異なる配列の固定されたポリヌクレオチドの一つ以上に結合していることを検出するときに使用するための基板を提供する。ある態様では、この基板は、ガラス支持材と、その支持材

の表面上の、ポリリシンなどのポリカチオンポリマーの被覆と、上述の被覆に静電的に非共有結合された異なるポリヌクレオチドから成る配列、とを含み、各個別の生体重合体は、ポリヌクレオチドの表面配列中の個別の規定された位置に付着される。

別の態様では、基板は、非透水性の裏地と、裏地上に形成された透水性フィルムと、フィルム上に形成された格子からなり、その格子は裏地からフィルムの表面の上まで高くした位置まで延在する非透水性格子要素の交差からなり、複数のセルを形成している。生体重合体配列は、各セル内に形成される。

また、本発明の一部を構成するものとして、第1の細胞タイプ内の複数の遺伝

子の各々の特異的発現を、第2の細胞タイプ内の同じ遺伝子の発現との関係で検出する方法を含む。この方法を実用するには、まず、2つの細胞タイプから単離されたmRNAから蛍光標識されたcDNAを得て生成する。ここで、第1および第2の細胞から得られたcDNAは、第1および第2の異なる蛍光リポーターを用いて標識される。

2つの細胞タイプから得られた標識されたcDNAの混合物を、2つの細胞タイプに由来する複数の既知の遺伝子を表現するポリヌクレオチドの配列に、cDNAが配列中の相補的配列のポリヌクレオチドに対してハイブリダイゼーションを行う条件下で添加する。次に、配列を(i)第1および第2の細胞タイプのひとつに由来するcDNAに優先的にハイブリダイズされる配列内のポリヌクレオチドが、異なった第1または第2の蛍光色をそれぞれ発色する蛍光励起条件下と、(ii)第1および第2の細胞タイプに由来し実質的に等しい数のcDNAにハイブリダイズされる配列内のポリヌクレオチドが各々異なる蛍光色を組み合わせた発色をする蛍光励起条件下で、蛍光によって試験する。2つの細胞タイプに含まれる既知の遺伝子の相対的な発現を、各スポットで観察される蛍光発色によって判定することができる。

本発明のこれらの目的および特徴とその他目的および特徴は、以下の本発明に係る詳細な説明を添付した図面に関連して読むことでより十分に理解できよう。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の一実施例に使用するために構成された開放型毛管分配ヘッドを有する試薬分配装置の側面図である。

図2A-2Cは、本発明の方法を示す一実施例に従って、図1の分配ヘッドを利用して疎水面に一定量のしたたりを送出するステップを示す図である。

図3は、本発明に係る方法に従って構成された被検体アッセイ領域から成る二次元配列の一部を示す図である。

図4は、本発明に従って配列を形成するための自動装置の構成要素を示す平面図である。

図5は、ポリ-L-リシン被覆スライド上に固定した400の蛍光標識されたDNA試料から成る実際の20×20配列の蛍光画像を示すが、ここでは400の要素が並ぶ配列

によって覆われた総面積は、16平方ミリメートルである。

図6は、酵母挿入断片とともにλクローンを含む1.8cm×1.8cmのマイクロ配列の蛍光画像を示し、蛍光信号は、約半分の緑色蛍光着色された、残り半分の赤色蛍光着色され、標識された酵母ゲノムを有する配列に対するハイブリダイゼーションから発生する。

図7は、図6のハイブリダイゼーション画像を酵母ゲノムの核型に翻訳したことを示す図であるが、ここでは図6までのマイクロ配列に示す要素は、以前に物理的に酵母ゲノムにマッピングした酵母DNA配列を含む。

図8は、24のcDNAクローンの0.5cm×0.5cmのマイクロ配列の蛍光画像を示すが、このマイクロ配列は、緑色蛍光着色で標識された植物である野生型シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) から得られたすべてのcDNAと、赤色蛍光着色で標識された植物である形質転換型シロイヌナズナから得られたすべてのcDNAを用いて同時にはハイブリダイズさせたものであり、矢印は形質転換型シロイヌナズナに導入された遺伝子を表現するcDNAを示す。

図9は、格子の形状のバリエーションによって形成されるセルの配列を有する基板を示す平面図である。

図10は、図9の基板のセルの1つの拡大平面図であり、セル内にポリヌクレオチド領域から成る配列が示されている。

図11は、図9の基板の拡大断面図であり、その図の区画のラインに沿ってなされたものである。

図12は、4つの象限各々にM13クローンの4つの同一配列を含む3cm×3cmのニトロセルロース支持体のスキャン画像を示す図であり、各象限は、開放面ハイブリダイゼーション法 (open face hybridization method) を用いて異なるオリゴヌクレオチドに対して同時に予めハイブリダイズされている。

発明の詳細な説明

1. 定義

別途指示がない限り、以下に定義する用語は、以下の意味で用いられる。

「リガンド」は、リガンド/抗リガンド結合対の一方の要素を示す。例えば、

リガンドは、相補的にハイブリダイズされた核酸の二重らせん結合対の一方、エフェクター／受容体結合対のエフェクター分子、あるいは、抗原／抗体結合対または抗原／抗体フラグメント結合対における抗原であっても良い。

「抗リガンド」は、リガンド／抗リガンド結合対のもう一方の要素を示す。例えば、抗リガンドは、相補的にハイブリダイズされた核酸の二重らせん結合対のもう一方、エフェクター／受容体結合対の受容体分子、あるいは、または抗原／抗体結合対または抗原／抗体フラグメント結合対における抗体または抗体フラグメントであっても良い。

「被検体」または「被検体分子」は、分子を示し、典型的には、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドなどの高分子を示し、その存在、量および／または同一性は、測定すべきものである。被検体は、リガンド／抗リガンド対の一要素である。

「被検体特異アッセイ試薬」は、被検体分子に特異的に結合するのに効果的な分子を示す。この試薬は、リガンドの／抗リガンド結合対のもう一方の要素である。

「支持体上の領域から成る配列」は、好ましくは、各々が有限の面積を有し、支持体表面に形成された異なる領域から成る直線状または2次元状の配列である。

「マイクロ配列」は、少なくとも約100/cm²、好ましくは少なくとも約1000/cm²の離散的な領域の密度を有する領域の配列である。マイクロ配列の領域は、一般に広がりがあり、約10-250 μ mのレンジの直径を有し、配列内の他の領域からおおよそ同じ距離だけ離れている。

支持面は、その表面に付着した水性媒体の液滴が、付着された液滴の面積から実質的にはみ出て拡散しなければ、「疎水性」である。すなわち、その表面には、液滴との疎水性相互作用によって、表面に付着した液滴の拡散を防止する作用を営む。

「メニスカス」は、液体の表面張力の結果として流路中の液体の底部が形成する凹面または凸面を意味する。

「異なる生体重合体」は、マイクロ配列を形成する生体重合体に適用される場合には、異なる生体重合体配列、および／または同じまたは異なる生体重合体の異なる濃度および／または異なる生体重合体の異なる混合物もしくは異なる濃度の生体重合体を含む異なる混合物に基づいて、他の配列要素とは区別される配列要素である。このため、「異なるポリヌクレオチド」とは、その要素として(i)各要素が規定量を有する異なるポリヌクレオチド、(ii)段階的に異なる所定の配列のポリヌクレオチド、および／または(iii)2つ以上の異なるポリヌクレオチドから成る組成の異なる混合物を含む配列である。

「細胞タイプ」とは、例えば組織、器官、または分化の所定の状態、または所定の症状または遺伝的構成に対応する細胞など、所定の供給源から得られた細胞である。

II. ミクロ配列の形成方法

この節では、支持体または基板上に被検体アッセイ領域のマイクロ配列を形成する方法を説明する。この場合において、各配列中の各領域は、既知量の選択された被検体特異試薬を有する。

図1は、本発明に係る方法を実施するときに有用な試薬分配装置10の部分概略図である。この装置は、一般に、細長い開放毛管流路14を有する試薬分配装置12を含み、以下に説明する16などで示されるある量の試薬溶液を保持することができる。毛管流路は、一对の互いに距離を空けた同じ広さの細長い部材12a、12bによって形成され、お互いに対して先細になり流路の下端の先端すなわち先端領域18で収束する。より一般的には、開放流路は、少なくとも2つの細長く互いに距離を空けた部材で形成され、それらはある量の試薬溶液を保持することができ、先端領域を有し、先端領域で流路内の水溶液がメニスカスを形成し、図2Aの20で示す凹型のメニスカスを呈するように形成されている。分配装置の開放流路構造の効果については後に述べる。

さらに図1について述べると、分配装置は、分配装置を迅速に支持面に近づけたり支持面から遠ざけたりして、分配装置の既知量の溶液を支持体に付着させるための構造を有するが、これについては図2A-2Cを参照して以下に説明する

。図示の実施例では、この構造はソレイド22を含み、これはソレノイドピストン24を迅速に下方向に引いてから、ピストンにバネによる付勢を与えるなどして、図示のように通常的位置までピストンを解放する。この分配装置は、図示のように、接続部材26によってピストンに接して移動される。直前でのべたような移動構造は、本文では、分配装置を支持体に係合するように移動させ、既知量の流体を支持体上に分配させるための分配手段としても利用される。

直前で述べた分配装置は、アーム28に接し、このアーム28によって直線方向またはx-Y平面内を、分配装置が選択された分配位置に定まるように移動されるが、これについては以下に説明する。

図2A-2Cは、直前で説明した分配装置内の既知量の試薬溶液を、30で示される支持体のような支持体の表面に付着させる方法を図示したものである。この支持体は、重合体、ガラス又はその他の固形で31に示すような表面を有する支持体である。

一般的な一実施例では、表面は相対的に親水性、すなわち、湿潤性の表面であり、たとえば自然の結合または共有結合によって付着した帯電性の反応基を有している。このような表面は以下に説明するが、ポリ-L-リシンなどのポリカチオンポリマーから成る吸収層を有するガラス面である。

別の一実施例では、表面は相対的に疎水性の特性、すなわち、表面に付着した水性媒体がビードになる特性を有するか、有するように形成されている。ポリスチレン、ポレプロピレン、ポリエチレンなどの種々の既知の疎水性重合体は、ガラスや種々の潤滑材やその他の支持体表面に適用することができる疎水性フィルムがもっているような所望の疎水特性を有する。

最初に、分配装置には、選択された被検体特異試薬溶液を充填する。すなわち洗浄した後で分配装置先端を試薬溶液に浸し、毛管流が分配流路に入ることによって流路を満たす方法によってである。ここで、分配装置は支持体表面に対して選択された位置に移動し、分配装置先端を試薬を付着させる支持体表面の位置の上に配置する。この運動は、分配装置先端が図2Aに示すように高い位置に来たときに始まり、この位置は一般には少なくとも1-5mm基板の表面より上方である

。このように分配装置を位置決めすると、ソレノイド22は起動され、分配装置先端を基板表面に迅速に近づけかつ遠ざけるように動かし、その表面と瞬時の接触をして、その結果、分配装置先端を支持体表面に軽く打ちつけることになる。この表面に対する先端の打ちつけ運動は、先端流路中に生じた液体のメニスカスを壊し、先端の液体を支持体表面に接触させるよう作用する。次に、これにより、液体が先端と表面の間の狭い空間に流れ込み、図2Bに示すように液体を分配装置の流路から引き出すように作用する。

図2Cは、先端から支持体表面上までの液体の流れを示すが、この場合、支持体表面は疎水面である。この図は、液体が分配装置から支持体表面に、液体ビード32を形成するまで流れ続けることを示している。所定のビードサイズ、すなわち、所定の容量で、液体が表面に流れる傾向はビードと支持体表面の疎水面相互作用によって平衡になるので、表面上のビードの総面積は制限され、液滴の表面張力によってビードに所定の曲率が付与されることになる。この時点で、ビードは所定容量に達し、分配装置先端が引き戻される際に、分配装置先端はビードと接触を維持していることは、ビード容量にはほとんどまたは全く影響を与えない。

液体をより親水性の高い表面に分配する場合、液体はビードを形成する傾向が小さいので、分配された容量は、図2Bおよび2Cに示す位置などの支持体表面との近接点での分配装置先端の総停止時間により、より影響を受ける。

本方法によって提供される所望の付着容量、すなわち、ビード(bead)容量は、好ましくは2p1 (ピコリットル) から2n1 (ナノリットル) であるが、100n1以上の容量を分配させることもできる。選択された分配容量は、(i)分配装置先端の「足型(footprint) | すなわち先端によって液体が広がる面積と、(ii)支持体表面の疎水度、(iii)先端を支持体表面に接触している時間と先端の支持体表面からの引き戻し速度と、に影響されることは理解されよう。さらに、ビードのサイズは、媒体の粘性を高めることによって低減し、分配装置から支持体表面に流れる時間を効果的に低減することができる。液滴のサイズは、支持体表面の疎水性

格子パターンによって囲まれた親水領域に液滴を付着させることによって、さらに限定することができる。

典型的な一実施例では、分配装置先端は、支持体表面に対して迅速に打ち付けられるが、そのときの支持体に接する総滞留時間は1ミリセカンド未満であり、支持体からの上昇速度は約10cm毎秒である。

図2Cに示すように、支持体に接触して形成されるビードは半球のビードで、ほぼ分配装置先端の幅に等しい直径を有すると仮定すると、分配装置先端の幅(d)

に対して形成されるビードの容量は、以下の表1に示すような値になる。表からわかるように、ビードの容量は2plから2nlであるが、幅のサイズが約20-200 μ mに増加するにつれて、大きくなる。

表1

d	容量 (nl)
20 μ m	2×10^{-5}
50 μ m	3.1×10^{-4}
100 μ m	2.5×10^{-3}
200 μ m	2

所定の先端サイズでは、ビード容量は、表面の疎水性を高めること、先端と表面の接触時間を低減すること、先端が表面から離れる速度を増加すること、および/または媒体の粘性を高くすること、によって調整する方法で低減することができる。こうしたパラメータを固定すれば、所望のピコモルからナノモルまでの範囲で選択された付着容量を、再現性のある方法で達成することができる。

支持体のある選択された位置にビードを付着させた後、先端は一般に第二の支持体の対応位置に移動し、液滴をその位置に付着させるが、この処理は、試薬の液滴が複数の支持体の各々の選択位置に付着するまで繰り返される。

次に先端を洗浄して試薬液を除去し、別の試薬液を充填すると、この試薬を各支持体の各々の別の配列位置に付着させる。一実施例では、先端を洗浄し再充填

するには、(i)装置の毛管流路を洗浄溶液中に浸すステップと、(ii)毛管流路に引き込まれた洗浄害液を除去するステップと、(iii)毛管流路を新たな試薬溶液中に浸すステップによって行われる。

上述から、ピンセット様の開放毛管分配装置先端を備えることによって、(i)先端の開放流路によって迅速、効率的な洗浄と新たな試薬を先端に再充填する前の

乾燥が容易になり、(ii)受動的な毛管作用によって試料を直接標準マイクロウェル板から充填し、多数の配列を焼き付けるために十分な試料を開放毛管溜めに保持することができ、(iii)開放毛管は、閉鎖毛管よりも細孔がつまることが少なく、(iv)開放毛管は、液体送出のために底面に完全に直面する必要がない、という長所があることは理解できよう。

直前で述べたような方法に関連する支持体40の表面38に形成されたマイクロ配列36の一部を図3に示す。この配列は、複数の被検体特異試薬領域である領域42などから形成され、各領域は異なる被検体特異試薬を含むことができる。上述したように各領域の直径は、好ましくは20-200 μm の範囲である。各領域とそれに最も近い(斜めではない)隣接領域の間隔は、中心から中心まで(44に示す)を測定すると、好ましくは約20-400 μm である。このため、例えば、中心間距離が約250 μm である配列は、約40領域/cmまたは1,600領域/cm²である。配列形成後、各領域を形成する液滴を蒸発させるよう支持体を処理し、所望の配列が乾燥するまで放置、全体を相対的に平坦にする。このような乾燥処理は、加熱または真空下でも行うことができる。

ある例では、被検体試薬を含む液滴を最初に再水和させてから、より多くの時間をかけて支持体に吸収させることが望ましい。被検体試薬を湿性の環境に配置し、液滴が配列操作完了まで乾かないようにすることもできる。

III. 配列形成のための自動装置

別の態様では、本発明は、配列の各領域が既知量の選択された被検体特異試薬を有する、被検体アッセイ領域から成る配列を支持体上に形成するための自動装置を含む。

図4は、本発明に係る装置の部分平面概略図である。装置内の分配装置72は、図1に関して説明したような基本構造を有し、実質的には図1および図2A-2Cに示したように、先端で終結する開放毛管流路を有する分配装置74を含む。

この分配装置は、分配装置保持器に取り付けられ、分配位置に接近したり離れたりし、分配装置の先端が支持体表面を軽くたたき、選択された容量の試薬溶液を上述のように分配する仕組みになっている。この運動は、上述のようにソレノイド76によって行われる。ソレノイド76は、制御装置77に制御されるが、その動作については後述する。ソレノイドは、本書では、分配装置が支持体に対して規定の配列位置に位置決めされたときに、分配装置保持器を移動して支持体に係合させる分配手段でもある。

分配装置保持器は、制御装置77に制御されるステッパモータ82によって、所望の方向に駆動（旋回）されるウォームスクリュウ80にねじ込んで取り付けられるアーム74に当接して運ばれる。図の左端では、ねじ80がねじの軸周囲を回転するためのスリーブ84に接続されている。他方の端では、スクリュウはステッパモータのドライブ・シャフトに取り付けられており、そのステッパモータは次にスリーブ86に当接して運ばれる。分配装置保持器、ウォームスクリュウ、ウォームスクリュウを取り付ける2つのスリーブおよび装置を図の「x」（水平）方向に移動するために使用されるステッパモータは、本書ではまとめて配置アセンブリ86と呼ばれるものを形成する。

配置アセンブリは、精確なミクロの範囲の運動をねじ方向すなわち図のx軸方向に沿って行うよう構成されている。ある形態では、アセンブリは、分配装置をx軸方向に5-25 μ mの範囲で選択された距離だけ移動するよう機能する。別の形態では、分配装置ユニットは、x軸方向に数ミクロン又はそれ以上の増分変化量で精確に移動することができ、分配装置を隣接支持体上の対応する位置に位置決めするが、これについては後述する。

さらに、配置アセンブリは、図の「y」軸（垂直）方向に移動して、分配装置を選択されたy軸の位置に位置決めするよう取り付けられる。このアセンブリを

取り付ける構造は、一対フレームバー90、92の間に剛体的に取り付けられた固定ロッド88と、一対のフレームバー96、98の間で回転するよう取り付けられたウォームスクリュー94と、を含む。ウォームスクリューは、制御装置77に制御されて動作するステッパモータ100によって駆動（回転）される。ス

テッパモータは、図のようにバー96に取り付けられる。

直前で記述したようなウォームスクリュー94とモータ100を含む構造は、ねじ方向すなわち図のy軸方向にそってミクロの範囲の精確な運動を行うように作られている。上述したように、この構造は、隣接支持体上の対応位置に分配装置を位置決めするために機能し、ある形態では5-250 μ mの範囲で選択された距離だけy軸方向に分配装置を移動し、別の形態では精確に数ミクロン（ μ m）又はそれ以上だけ分配装置を移動しする。

配置アセンブリとこの配置アセンブリをy軸方向に移動させる構造は、本書では配分装置保持器を支持体に対して選択された配列位置に位置決めする位置決め手段として集合的に呼ぶことにする。

本装置中のホルダー102は、試薬領域のミクロ配列が装置によって形成されるべき支持体104などの、複数の支持体を保持するよう機能する。ホルダーは、スロット106などの多数のくぼみスロットを備え、支持体を収容し、それらを分配装置移動手段を取り付けるフレームバーに対して精確に選択位置に位置決めする。

上述したように、配分装置の制御装置は、2つのステッパモータと分配装置ソレノイドを、装置を自動操作するために設計されたシーケンスで、複数の支持体のそれぞれの上に位置する試薬領域から成る選択されたミクロ配列を形成するときに、機能する。

制御装置は、従来のマイクロプロセッサの制御原理に従って、適切な信号を各々のソレノイドおよび各々のステッパモータに、所定の時間が経過したときに、適切な信号送信時間中に、供給するように構成される。制御装置の構成とユーザによって所望の配列パターンを達成するように選択された設定は、以下の一般的な装置操作方法の説明から理解できよう。

まず、1つ以上の支持体をホルダーの1つ以上のスロットに配置する。次に、分配装置を支持体上に分配すべき第1の試薬溶液を含むウェル（図示せず）の真上の位置まで移動させる。このとき、この分配装置ソレノイドは、分配装置先端を

このウェル内まで下げ、分配装置の毛管流路を満たすように作動する。ここで、モータ82、100は第1の支持体の選択配列位置に分配装置を位置決めするよう動作する。次に、分配装置のソレノイドは、この位置に選択量の試薬の液滴を配分するように動作する。上述のように、この動作は、好ましくは2plから2nlまでの試薬溶液の選択された量を配分するのに有効である。

分配装置は、隣接支持体の対応位置に移動され、同じ程度の量の溶液をこの位置に分配する。この処理は、試薬が各々の支持体上のあらかじめ選択された対応する位置に分配するまで繰り返される。

1つの試薬を支持体上の3つ以上の配列位置に分配することを所望する場合、分配装置を各支持体の異なる配列位置まで移動させてから、分配装置を新しい支持体に移動してもよいし、溶液を各支持体上の個別の位置に、ある選択された位置に配分してから、各々の新たな配列位置についてこのサイクルを繰り返してもよい。

次の試薬を配分するには、分配装置を洗浄溶液（図示せず）上に配置し、分配装置先端をこの溶液に浸したり出したりする動作を、試薬溶液が実質的に先端から洗い流されるまで続ける。溶液は、浸す度に先端から減圧装置、圧縮空気スプレー、スポンジなどによって除去することもできる。

これで、分配装置先端を第2の試薬ウェルに浸し、充填した先端を第1の支持体の第2の選択した配列位置に移動される。次に、対応する第2の配列位置の各々での試薬配分処理は上述のように実行される。この処理を繰り返して、最終的には完全な試薬溶液のマイクロ配列を各々の支持体上に形成させる。

IV. ミクロ配列基板

この節では、基板表面上に保持される生体重合体のマイクロ配列を有する基板の実施例について説明する。小節Aでは、マルチセル基板すなわちその各セルが多

孔性の面に形成された異なるポリヌクレオチドなどの異なる生体重合体から成るマイクロ配列、好ましくは同一のマイクロ配列を含む。小節Bでは、ポリカチオンポ

リマーを塗布したスライドガラスに結合した異なるポリヌクレオチドから成る配列マイクロ配列について説明する。

A. マルチセル基板

図9は、本発明に従って構成される基板110の平面図である。この基板は、基板面上に形成されるセル114、116などの8×12のセルから成る矩形配列112を有する。図10を参照すると、セル114などの各セルは、既知の番地によって指定できるマイクロ配列の領域で、異なるポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの異なる生体重合体から成るマイクロ配列118を支持する。2つのこうしたマイクロ配列を形成する領域を120で示したが、これらは図3に示す異なる生体重合体から成るマイクロ配列を形成する領域42などの領域に対応する。

図9に示す96セル配列は、一般に、約12ミリから244ミリまで幅と、8ないし40ミリメートルの長さがあり、配列中のセルの幅は配列の1/12であり、長さは1/8である。すなわち、約1-20ミリメートルの幅と、1-50ミリメートルの長さがある。

基板の構造として、図11に断面が示されているが、これは図9の線124に沿って眺めた拡大断面図である。基板は、スライドガラスや剛性ポリマーシートなどの非透水性の裏地126を含む。裏地の表面に形成されているのが、透水性フィルム128である。このフィルムは、ニトロセルロース膜などの多孔性膜材料またはナイロン、ポリプロピレンなどの多孔性ウェブ材料、PVDF多孔性ポリマー材料などから形成されている。フィルム厚さは、好ましくは10から1000 μ mの間である。このフィルムは、未硬化の材料を裏地に噴霧または塗布することによって、またはあらかじめ膜を裏地に当てることによって利用することができる。裏地およびフィルムは、Schleicher and Schuell Corporationから入手できるプラスチックの裏地のついたニトロセルロースフィルムなどの市販の材料からあらかじめ形成された材料として入手できる。

図11をさらに参照すると、基板のフィルムで覆われた表面は、線130、132などの非透水性の格子線によって所望のセルから成る配列に仕切られ、この線はフィルムから裏地まで侵入し、図示のようにフィルム表面上に延在しているが、一般にはフィルム表面上方に100ないし2000 μm の距離で延在する。

格子線は、未硬化かそうでなければ流動性の樹脂またはエラストマー溶液を塗ってから、その材料を裏地まで多孔性フィルムにまで浸透させて、格子線を硬化またはそうでなければ固化してセル配列基板を形成することによって基板上に形成される。

格子として好ましい材料は、Loctite Corporatinから入手可能な流動性のシリコーンである。バリアー材料は、狭い注入器（22ゲージなど）を通じて空気圧または機械圧を利用して押し出すことができる。注入器は、支持体に対してバリアー要素を格子パターンとして焼き付けるように移動する。押し出されたシリコーンのビードは、支持体の細孔に運ばれ、硬化して支持体の領域を分離する浅い防水性バリアーを形成する。

別の実施例では、バリアー要素は、ワックスを基材とした材料またはエポキシなどの熱硬化性材料であってもよい。バリアー材料は、支持体に焼き付けた後に紫外線に暴露した紫外線硬化材料であってもよい。バリアー材料は、シルクスクリーン印刷などの印刷技術を用いて支持体に塗布することもできる。バリアー材料は、細孔を密封し非透水性バリアー要素を形成する多孔性支持体のヒートシーラスタンプであってもよい。バリアー材料は、薄層にするかまたはその他の方法で支持体に付着させた浅い格子であってもよい。

可塑性の裏地をつけたセルロースに加えて、支持体は非多孔性の裏地を用いるかまたは用いないに関わらず、実質的に多孔性膜であればよい。こうした膜は、多数の業者から容易に入手できるものであり、ナイロン、PVDF、ポリスルホンなどから形成されている。別の実施例では、バリアー要素をバリアーとして機能させて、アッセイ試薬の相互汚染を防止するほかに、多孔性膜を非多孔性膜の裏地に付着させるために使用することもできる。

別の実施例では、支持体は、非多孔性材料からなってもよい。バリアーは、生

体分子の配列を支持体に焼き付ける前または後のいずれでも、焼き付けることができる。

格子線によって形成されるセルとその基盤となる裏地は、非透水性であり、セルの多孔性フィルム上に突出する側方バリアーを有していることは理解できよう。したがって、規定量の試料を各ウェルに配置しても、隣接セル同士の試料が相互に汚染させるリスクはなくなる。図11は、規定量の試料である試料134などがセルに入っていることを示す。

上述したように、各ウェルは、異なる生体重合体から成るマイクロ配列を含む。一般的な実施例では、ウェルのマイクロ配列は、異なるポリヌクレオチド配列など、異なる生体重合体から成る同一の配列である。こうした配列は、第II節で記述した方法に従って形成される。すなわち第1の選択されたポリヌクレオチドを各セルの同じ選択されたマイクロ配列の位置に付着させてから、第2のポリヌクレオチドを各セルの異なるマイクロ配列の位置に付着させて、これを全く同一のマイクロ配列が各ウェルに形成されるまで続ける。

好ましい実施例では、各マイクロ配列は約 10^3 個の異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチド生体重合体を約 1cm^2 未満の表面積あたりに含む。また好ましい実施例では各マイクロ配列領域の生体重合体は、規定量である約0.1フェムトモルから100ナノモルまでの範囲で存在する。生体重合体を高密度に配列、各領域が明確に規定された量の付着材料から形成されているようにするには、II節で記載したマイクロ配列形成方法に従えばよい。

好ましい実施例では、生体重合体は、少なくとも約50塩基対の長さを有するポリヌクレオチドであり、すなわち、配列表面上での並列逐次ポリマー合成を伴う経路によって高密度の配列を形成することができるオリゴヌクレオチドよりも実質的に長い。

ポリヌクレオチド配列の場合、アッセイ手続きでは、微量の標識されたDNAプローブ混合物を標準ハイブリダイゼーション溶液に含めて、各セルに充填する。
こ

の溶液は拡散し、マイクロ配列全体を覆い、バリアー要素でせき止められる。次に

、支持体はアッセイに必要な適切な温度の恒湿室でインキュベートされる。

各アッセイは、ハイブリダイゼーション溶液が恒湿室で水蒸気によって適切に水和されるので、「表面を覆わない」方法で行うことができ、さらに密封する必要はない。インキュベーションステップの終わりで、多数のマイクロ配列を含む支持体を丸ごとすすぎ、アッセイ試薬を十分に希釈し、有意な相互汚染を防ぐ。次に、支持体全体を必要であれば、検出試薬に反応させて、標準的な比色手段、放射線検出手段または蛍光検出手段を用いて分析する。すべての処理ステップおよび検出ステップは、支持体上のマイクロ配列すべてに同時に行われるので、支持体上のマイクロ配列すべてのアッセイ条件は均等に確保される。

B. スライドガラスによるポリヌクレオチド配列

図5は、本発明の別の態様に従って形成される基板136を示すもので、この基板136は標識されたポリヌクレオチドが複数の異なるポリヌクレオチドの1つ以上に結合していることを検出するときに使用することを意図したものである。この基板は、その表面にポリカチオンポリマーの被覆、好ましくはポリリシンやポリアルギニンなどのカチオンポリペプチドから成る被覆を形成させた基板138を含む。ポリカチオン被覆上には、異なるポリヌクレオチドから成るマイクロ配列140が形成され、各々の配列は領域142などの既知の選択された配列領域に局在している。

このスライドは、ポリ-L-リシンなどのポリカチオンポリマーから成る均等な厚さのフィルムをスライドの表面に配置し、フィルムを乾燥させ乾燥被覆を形成することによって被覆される。添加されたポリカチオンポリマーの量は、ガラス面のポリマーから成る少なくとも単層を形成するには十分である。ポリマーフィルムは、表面の負のシリル-OH基とポリマーの帯電したアミン基の静電結合によって表面に結合される。ポリ-L-リシンで被覆されたスライドガラスは、Sigma Chemical

Co. (St. Louis, MO) などから市販されているものを入手することができる。

マイクロ配列を形成するには、規定量の異なるポリヌクレオチドをポリマーで被

覆したスライドガラス上に付着させるが、これについてはII節で述べたとおりである。この基板の重要な特徴によれば、付着したポリヌクレオチドは、試料中のリポーターで標識されたポリヌクレオチドを基板の配列中の相補的配列（一本鎖）のポリヌクレオチドにハイブリダイゼーションさせる条件下で、水性DNA試料を基板に塗布したときに、被覆されたスライド面に非共有結合的に結合されて残る。この方法は、例1および例2に示す。

この特徴を具体的に説明すると、直前で述べた種類の基板は、同じ配列のポリヌクレオチドを有するが、蛍光標識された相補的DNAにハイブリダイゼーション条件下で混合されたものである。洗浄してハイブリダイゼーションされていない材料を除去した後、この基板を低倍率蛍光顕微鏡によって調査した。この配列は、配列領域が相対的に均等な標識パターンとして目視することができる。

好ましい実施例では、各マイクロ配列は、少なくとも 10^3 個の異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチド生体重合体を約 1cm^2 未満の表面積あたりに含む。図5に示される実施例では、約 16mm^2 の面積又は 2.5×10^3 領域/ cm^2 にマイクロ配列を400領域含む。また、好ましい実施例では、各マイクロ配列領域中のポリペプチドは、ポリヌクレオチドの場合は、約0.1フェムトモルから100ナノモルまでの規定量で存在する。上述のように、この種の高密度配列を形成し、各領域を明確に規定された量の付着材料から形成できるようにするには、II節で説明したマイクロ配列形成方法に従えばよい。

好ましい実施例では、ポリヌクレオチドの長さは、少なくとも約50塩基分であり、実質的には、さまざまなin situ合成経路によって高密度配列に形成することができるオリゴヌクレオチドよりも長い。

V. 有用性

本発明に従って調製された固定した核酸配列から成るマイクロ配列は、多数の遺伝学的用途で大量ハイブリダイゼーションアッセイに使用することができ、例えば、ゲノムの遺伝的および物理的マッピング、遺伝子発現のモニタリング、DNAシーケンシング、遺伝学的診断、生物の遺伝子型の決定、研究者へのDNA試薬の配布などに利用することができる。

遺伝子をマッピングする場合、遺伝子またはDNA断片のクローンを秩序よく並んだDNA断片の配列にハイブリダイズし、配列に利用されたDNA要素の同一性を、検出される配列のピクセルまたはピクセルパターンによって明確に確定する。遺伝子地図を作成するためのこうした配列の利用については、Nelson, et al. (1993)に記載されている。ゲノムの物理的地図を作成する場合、固定されたDNA断片のクローンの配列を、他のDNA断片クローンをを用いてハイブリダイズして、プローブ混合物のクローン化フラグメントが重なり、そのために配列上に固定化されたクローンに隣接するか否かを確立する。例えば、Lehrach, et alはこうした処理について述べている。

固定化されたDNAフラグメントの配列を遺伝学的診断に利用することもできる。具体的に説明すると、一つまたは複数の突然変異遺伝子から成る複数の形態を含む配列を、固定化された遺伝子の種類の一つとしか優先的に相互作用を行わない患者のDNAの標識された混合物を用いて探査することができる。

この相互作用を検出して、医学的な診断をすることができる。固定化されたDNAフラグメントの配列をDNAプローブ診断に使用することもできる。例えば、病原性微生物の同定は、未知の病原性のDNAの試料を多くの種類の既知の病原性のDNAを含む配列にハイブリダイズさせることによって、明確に確立することができる。同様の技術を遺伝子型が不明な生物に利用することもできる。cDNAとRNAなどのその他の遺伝学的に重要な分子を配列上に固定するか、配列に塗布する標識プローブ混合物として利用することができる。

ある利用例では、遺伝子を表現するcDNAクローンの配列を生物から得られるすべてのcDNAを用いてハイブリダイズし、遺伝子発現をモニタリングして研究または診断のために利用することができる。正常な細胞から得られるすべてのcDNAを

一色の発蛍光団で標識し、病的な細胞から得られたすべてのcDNAを別色の発蛍光団で標識し、同時にこれら2種類のcDNA試料を同じ配列のcDNAクローンにハイブリダイズすることで、2つの蛍光団の光度の比として、示差的に遺伝子発現を測定することができる。この2色の発蛍光団を使う実験を利用して、異なる組織タイプにおける遺伝子の発現、病状、薬物反応、環境因子に対する反応をモニタリ

ングすることができる。このようなアプローチの一例は、例2に示し、図8に関して説明する。

例として挙げると、範囲を限定する意図はないが、こうした手続きを利用すれば同時に病的遺伝子の中で既知の突然変異すべてについて多くの患者をスクリーニングすることができる。本発明を利用して、たとえば96個の同一の0.9cm×2.2cmの配列を一枚の12×18cmの可塑性ニトロセルロースを裏地にしたものの上に作成するなどして利用し、このとき、各マイクロ配列に、例えば、所定の遺伝子の既知の突然変異すべてを表現する100個のDNA断片を含めることができる。96患者から得られたDNA試料の各々から重要な領域を増幅し、標識し、96個の配列にハイブリダイズし、100 μ lのハイブリダイゼーション溶液で各アッセイを行うことができる。個々の配列の間にある約1の厚さのシリコンラバー要素を、ニトロセルロースの細孔を密封させ、各マイクロ配列の間の物理的バリヤーとして機能させることによって、患者の試料の相互汚染を防止することができる。96個の患者の試料を用いてアッセイされた96個のマイクロ配列すべてを含む支持体を、インキュベートし、すすぎ洗いし、標準の放射線検出手段、蛍光検出手段、比色検出手段を用いて、一枚の材料として検出し、分析する (Maniatis, et al., 1989)。従来、こうした手続きでは、96の独立した密封室で96の別個の膜を取り扱い、処理し、追跡していた。96個の配列すべてを一枚の材料として処理することによって、かなりの時間とコストを節約することが可能である。

アッセイのやり方を逆にすることもできるが、この場合、患者又は組織のDNAは配列要素として固定され、そして各配列は、突然変異を起こした異なる対立遺伝子または異なる遺伝子マーカーとハイブリダイズされる。格子のついた支持体を

並列非DNA・ELISAアッセイに用いることができる。さらに、本発明では、すべての標準検出方法を行う際に、浅いバリヤー要素を除去せずに、検出ステップを実行することができる。

上述した遺伝的用途に加えて、細胞全体、ペプチド、酵素、抗体、抗原、受容体、リガンド、リン脂質、ポリマー、drug cogener preparationまたは化学物質

の配列を、本出願に記載された手段によって、医学的診断、薬物の発見、分子生物学、免疫学および毒物学における大量スクリーニングアッセイのために作成することができる。

本発明のマルチセル基板の形態は、DNA断片から成る多くの秩序ある配列に対して多くのDNAプローブを迅速で便利にスクリーニングすることができる。これによって、遺伝学的調査および診断用に行うために多くの個別の配列を大量のスクリーニング処理し検出する必要はなくなった。多数のマイクロ配列を、同じ支持体上で作成し、各マイクロ配列を異なるDNAプローブに反応させることができる一方、支持体を一枚の材料として処理することができる。

以下は、本発明の一例を示すが、これに限定する意図はない。

例1

二色蛍光検出によって

酵母サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の ゲノムを表現するマイクロDNA配列に対する ゲノム複合体ハイブリダイゼーション

配列要素は、*S. cerevisiae*のゲノムDNA鋳型 (Riles, et al., 1993) の物理学的にマッピングされた λ クローンを用いて任意に増幅させたPCR (Bohlander, et al., 1992) 生成物である。PCRを λ ファージライゼート上に直接実施したところ、35kbの λ ベクター配列と5-15kbの酵母挿入断片配列の両方が増幅し、250-1500塩基対の長さのPCR生成物が均等に分布した状態になった。PCR生成物をSephadex G

50ゲル濾過器 (Pharmacia, Piscataway, NJ) を用いて濾過し、一晩かけて室温で蒸発させて乾燥させることによって濃縮させた。864増幅 λ クロンの各々をガラス上にスポットするための準備として、15 μ lの3 \times SCCで再度水和した。

マイクロ配列をポリ-L-リシン (Sigma) の層で被覆された顕微鏡用スライドガラス上で作成した。IV節に説明した自動装置によって、3 \times SCCの1 μ lの濃縮 λ クローン生成物を96ウェル貯蔵板から直接開放毛管焼き付け要素に充填し、スポット間に380ミクロンの間隔をあけて5nlまでの試料を40枚のスライド各々に付着させ

た。この処理を、864試料すべてと8の対照スポットの為に繰り返した。スポット操作が完了した後、スライドを恒湿室に2時間入れて再水和し、乾燥した80℃の減圧オーブン内で2時間以上焼成し、未吸収のDNAを除去してから、無水コハク酸を用いて処理し、標識されたハイブリダイゼーションプローブをポリ-L-リシンで被覆したガラス面に非特異的に吸収させた。使用直前に、配列上に固定されたDNAを稀釈水に入れて90度で2分間変性させた。

染色体をプールした実験では、サッカロマイセス・セレビシエの16本の染色体をCHEFアガロースゲル装置 (Biorad, Richmond, CA) を使って分離した。大きい方の6本の染色体を1つのゲルスライスに単離し、小さい方の10本の染色体を別のゲルスライスに単離した。DNAをゲル抽出キット (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて回収した。2つの染色体プールを標的λクローンに使用する方法と同じ方法で無作為に増幅した。増幅後、5 μ gの増幅染色体プール各々にKlenowポリメラーゼ (Amersham, Arlington Heights, IL) と一緒に、lissamine接合ヌクレオチド類似体 (Dupont NEN, Boston, MA) を大きい方の6本の染色体を含むプールに用い、フルオレセイン接合ヌクレオチド類似体 (BMB) を小さい方の10本の染色体に用いて、個別に任意のプライマー標識をつけた。2つのプールを混合し、限外濾過装置 (Amicon, Danvers, MA) を用いて濃縮した。

7.5 μ gのTEに含めた両方の染色体プールから成る5 μ gのハイブリダイゼーションプローブを沸騰水浴で変性させてから、氷上で急冷した。2.5 μ lの濃縮ハイブリダイゼーション溶液 (5×SSCおよび0.1%SDS) を添加し、10 μ lすべてを配列面

に移動し、カバーガラスで覆い、特注単スライド恒湿室に入れて、60℃で12時間インキュベートした。このスライドを室温で1.0×SSCおよび0.1%SDSで5分間すすいだ後、カバーを外しスキャンした。

特注レーザー蛍光スキャナーを使用し、2色のハイブリダイゼーション信号を1.8cm×1.8cmの配列から20ミクロンの解像度で検出した。スキャン画像は、特注の画像分析ソフトウェアを用いてグリッドを表示し分析した。重複する発光スペクトルによって発光団間の光学的クロストークを修正した後、配列上の各クロ

ーンに対する赤色および緑色のハイブリダイゼーション値をクローンの既知の物理学的地図の位置に相関したところ、コンピュータによって酵母ゲノムの色の核型が生成された。

図6は、2つの染色体プールのハイブリダイゼーションパターンを示す図である。赤色信号は、配列面上の λ クローンは、大きい方の6つの酵母染色体の1つから得たゲノムDNA断片のクローンを含むことを示す。緑色の信号は、 λ クローン挿入断片が小さい方の10の酵母染色体の1つに由来することを示す。オレンジ色の信号は、両方の染色体プールにクロスハイブリダイズさせた反復配列を示す。配列上の対照スポットは、ハイブリダイゼーションが特異的で再現的であることを確かめるものである。

配列要素として使用される各クローンに含まれるゲノムDNA断片の物理的地図の位置は、Olsonら(Riles, et al.)によって以前に測定されているので、図7に示されるように色の核型を自動的に生成することができる。核型上の染色体の断片の色は、その断片から得られたクローンを含む配列要素の色に対応する。核型の黒色領域は、配列上の誤った陰性の暗いスポット(10%)またはOlsonクロンライブラリには含まれないゲノム領域(90%)を表現する。大きい方の6本の染色体は、主に赤色であり、小さい10本の染色体は主に緑色であり、ハイブリダイゼーションプローブの元のCHEFゲルの単離に一致する。緑色のスポットを含む赤色染色体と赤色スポットを含む緑色染色体の部分は、おそらく元のライブラリの形成と増幅手続きおよびスポット手続きとにおける疑似(spurious)試料のトラッキングエ

ラーによるものであろう。

酵母ゲノム配列も、物理的地図作成の目的に蛍光的に標識された個々のクローンまたはクローンのプールを用いて探査された。配列に対するこれらのクローンのハイブリダイゼーション信号は、酵母の物理的地図上の位置に変換される。

例2

2色蛍光検出によって

cDNAクローンのマクロ配列に

ハイブリダイズされた すべてのcDNA

植物シロイヌナズナから得られたcDNA挿入断片を含む24個のクローンをPCRを利用して増幅した。塩を純粋なPCR生成物に添加し、 $3\times\text{SSC}$ の最終濃度にした。cDNAクローンを例1と同様の方法で、ポリ-L-リシンで被覆した顕微鏡スライド上にスポットした。cDNAクローンの中には、転写因子HAT4を発現するクローンがあり、これは以前植物シロイヌナズナの形質転換系を生成するのに使用されたが、この遺伝子は野生型のシロイヌナズナに見られる10倍のレベルで存在する (Scheena, et al., 1992)。

野生型のシロイヌナズナから得られたポリ-A mRNAすべてを標準的な方法を用いて単離し (Maniatis, et al., 1989)、cDNA生成物 (緑色蛍光) に標識するためにフルオレセインヌクレオチド類似体を用いて、すべてのcDNAを逆転写した。同様の手続きをシロイヌナズナの形質転換系に行ったが、この場合転写因子HAT4を標準の遺伝子転写プロトコルを用いてゲノムに挿入した。形質転換植物から得たmRNAのcDNAコピーをlissamineヌクレオチド類似体 (赤色蛍光) を用いて標識した。2ミクログラムのcDNA生成物を各型の植物から得て、一緒にプールし、例1と同様の方法で $10\mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション反応中でcDNAクローン配列にハイブリダイズした。すすいでからハイブリダイゼーション物を検出することも、例1

と同様に実行した。図8は、結果として生成された配列のハイブリダイゼーションパターンである。

遺伝子は、野生型及び形質転換シロイヌナズナにおいて均等に発現し、最終信号に緑色蛍光と赤色蛍光が等しく供給されたので、黄色を呈した。ドットは、さまざまな強度の黄色で呈示され、様々なレベルでの遺伝子発現を示す。転写因子HAT4を表現するcDNAクローンは、シロイヌナズナの形質転換系に発現したが、野生型のシロイヌナズナには発現せず、赤色ドットとして出現し (矢印で示す)、赤色標識された形質転換シロイヌナズナの転写因子が優先的に発現し、緑色標識された野生型の転写因子の発現が相対的に欠如していることが示されている。

遺伝子発現研究を行うためにマイクロ配列ハイブリダイゼーション方式を採用する長所は、部分的に高濃度のcDNAの種のそれぞれが $10\mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション反応中で得られることである。ハイブリダイゼーションプローブをPCR増幅させると別個のcDNAのそれぞれの種の真の遺伝的表現にバイアスをかけてしまうが、部分的に高濃度であれば、PCRを増幅させずに、稀少な転写物を検出することができる。

こうした遺伝子発現研究をゲノム分析に使用し、遺伝子がどの細胞タイプ、病状、発育状態および環境条件において発現されるかを明らかにすることができる。遺伝子発現試験を遺伝発現パターンを病状に実験的に相関させることによって、病気の診断に利用することができる。

例3

格子を設けた支持体上の 多重比色ハイブリダイゼーション

可塑性裏地をつけた一枚のニトロセルローズに、IV-A節の説明に従ってシリコーンラバーから形成したバリヤーを用いて格子をつけた。このシートは、 $10\times\text{SSC}$ で浸潤させ、放置して乾燥させた。図12に示すように、異なる酵母挿入断片を有する192M13クローン各々を、III節で説明した自動装置を用いて、支持体の4つの象限に400ミクロン離して配置した。左下の象限は、ハイブリダイゼーションの負の対照として利用し、その他の3つの象限をそれぞれIV-A節で説明したオープンフェースハイブリダイゼーション技術を用いて、異なるオリゴヌクレオチドで同時にハイブリダイズした。各配列の最初の2つの要素および最後の4つの要素は、比色検出ステップに対する正の対照である。

オリゴヌクレオチドをフルオレセインで標識し、アルカリ性ホスファターゼに接合した抗フルオレセイン抗体を用いて検出したところ、支持体 (Amersham) 上にNBT/BCIP染料が沈殿した。標識したオリゴとM13クローンが完全に一致し、裸眼では暗いスポットとして見ることができ、パーソナルコンピュータに取り付けられた光学スキャナ (HP ScanJet II) を用いて検出された。ハイブリダイゼーションパターンは、各象限において異なり、各オリゴは192のうちから塩基配列

が完全に一致する複数のユニークなM13クローンが検出された。開放毛管焼き付け先端によって、ニトロセルロース上にくぼみが残るが、これは画像を自動的に調整し分析することに利用することができる。

本発明を具体的な実施例および方法について述べてきたが、さまざまな変更および修正を本発明から逸脱せずに行えることは明らかであろう。

【図1】

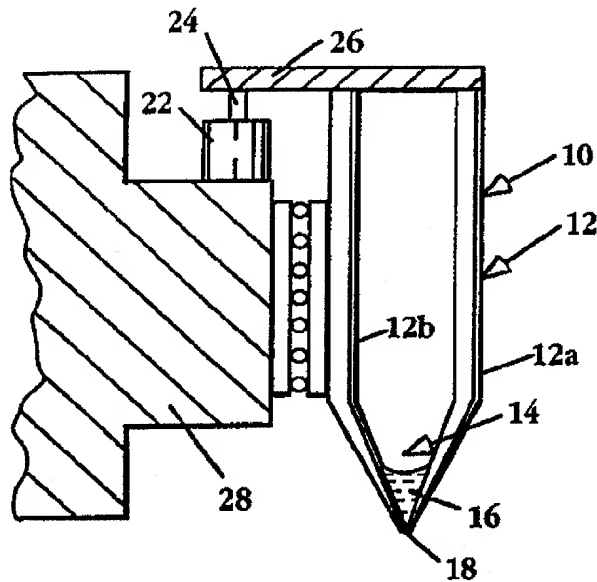
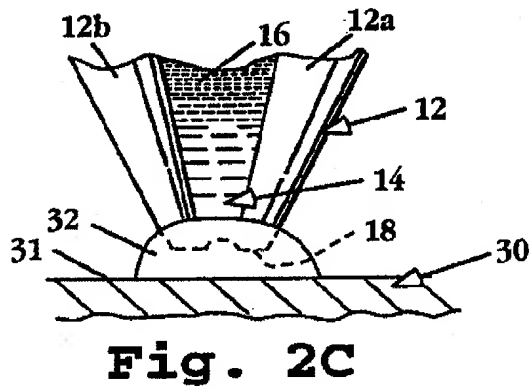
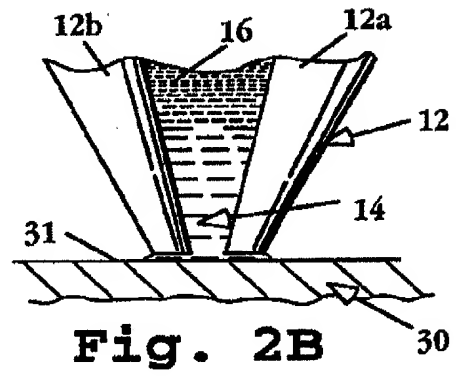
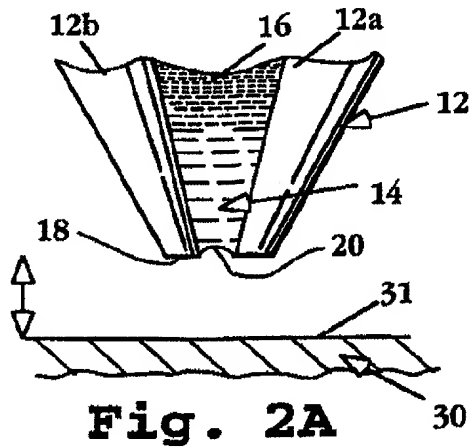
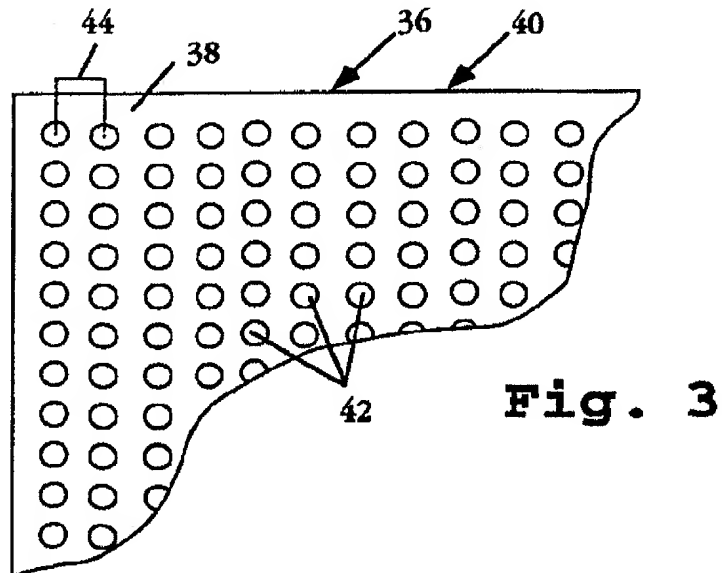


Fig. 1

【图2】



【图3】



【図4】

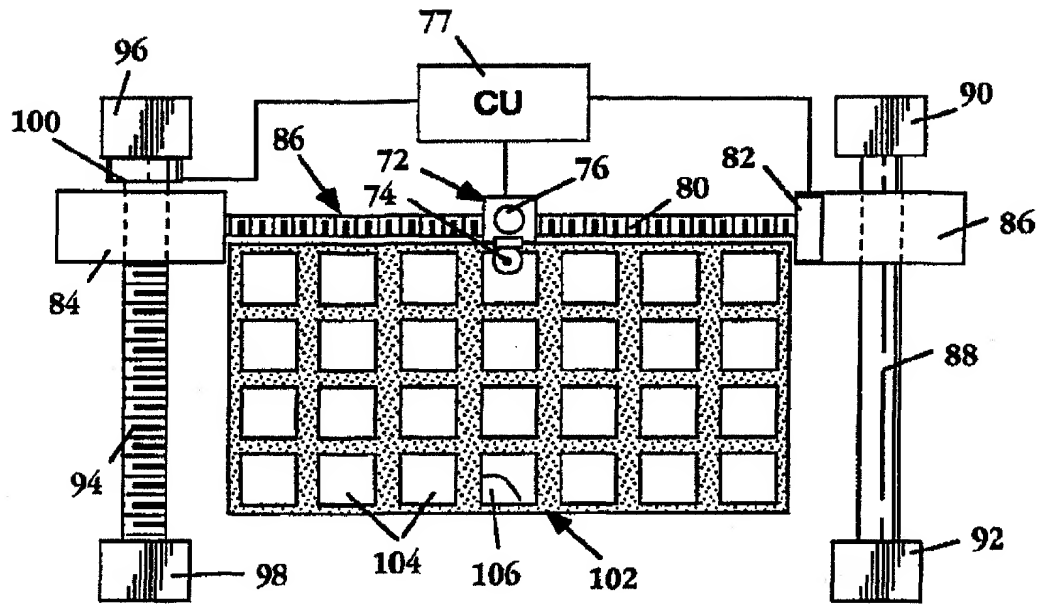


Fig. 4

【図5】

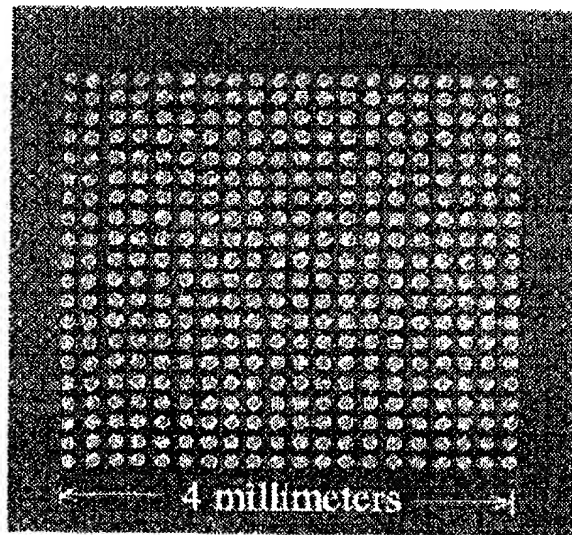


Fig. 5

【図6】

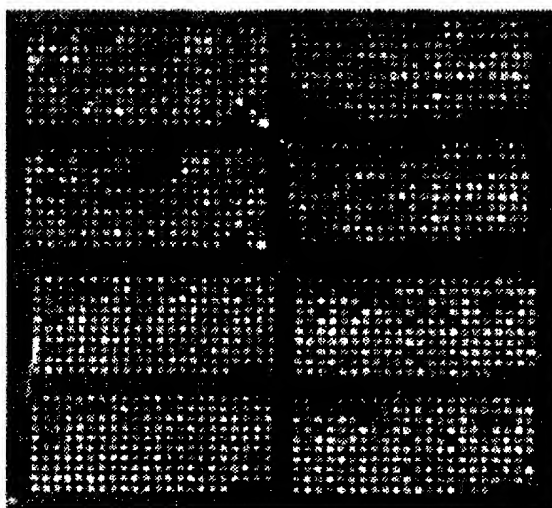


Fig. 6

【図7】

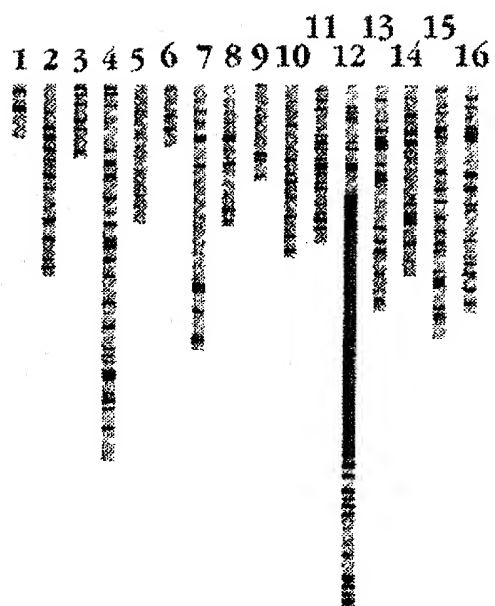


Fig. 7

【図8】

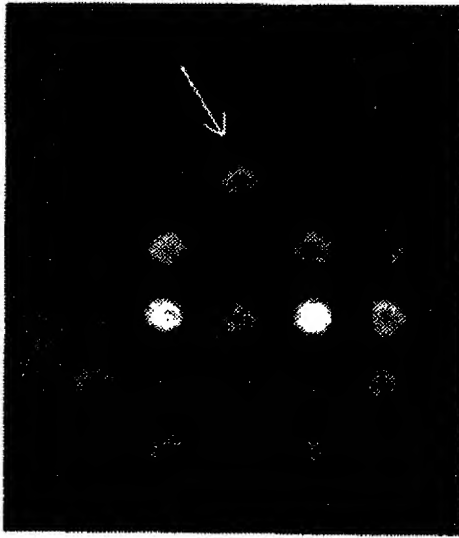


Fig. 8

【図9】

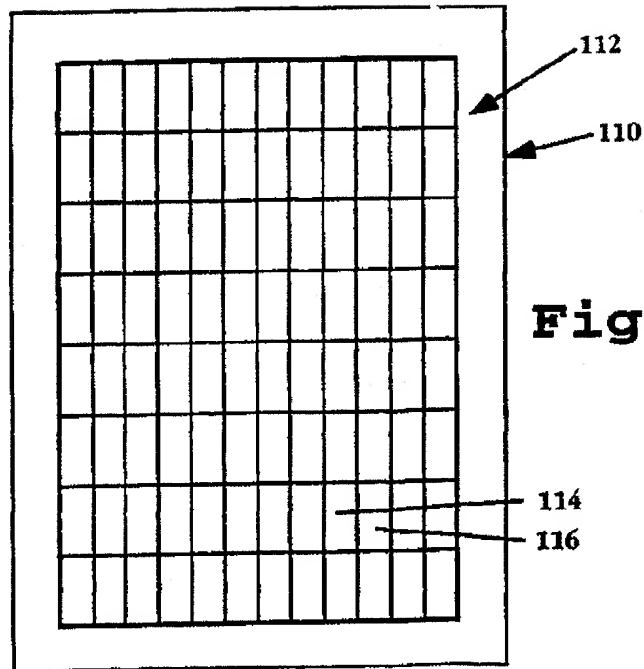


Fig. 9

【図10】

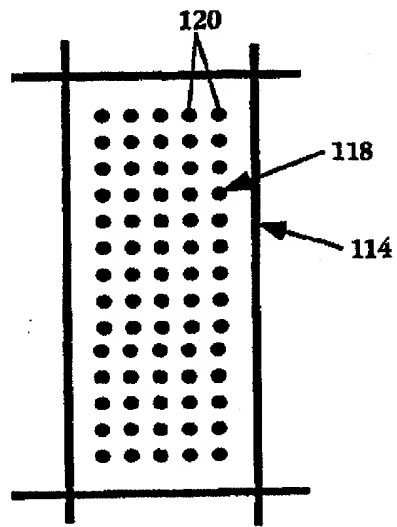


Fig. 10

【図11】

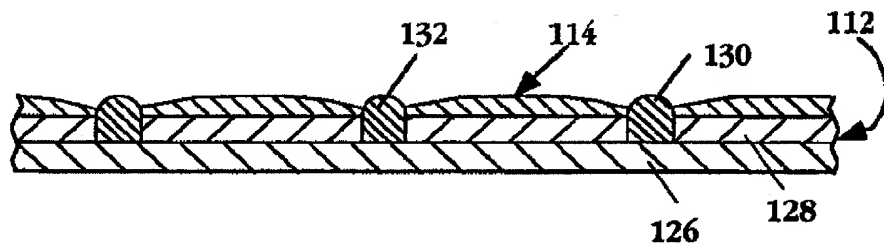


Fig. 11

【図12】

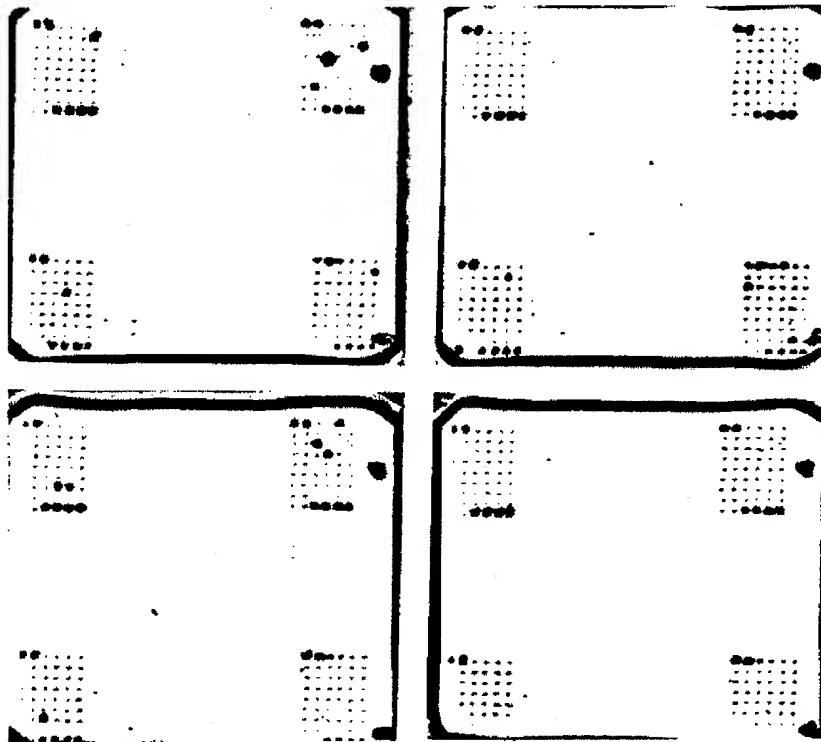


Fig. 12

【手続補正書】

【提出日】 1997年3月4日

【補正内容】

請求の範囲

1. 支持体上に被検体特異アッセイ領域からなるマイクロ配列を形成する方法であって、

(a) 被検体特異アッセイ試薬を含む溶液を(i)違いに離れて同一方向に広がる細長い部材によって形成され、(ii)選択された量の試薬溶液を保持することができ、(iii)流路中の試薬溶液がメニスカスを形成する先端領域を有する、細長い毛管流路を有する試薬分配装置に充填するステップと、

(b) 分配装置の先端を支持体上の規定位置で支持体に対して軽く打ち付け、毛管流路中のメニスカスを壊すように衝撃を与え、選択された量の試薬溶液を支持体上に付着させるステップと、

(c) 異なる被検体特異アッセイ試薬を用いて、ステップ(a)及び(b)を繰り返し、マイクロ配列が形成されるまで、支持体上の異なる規定位置に付着させるステップと、

を備えるマイクロ配列形成方法。

2. 複数の支持体上に被検体特異アッセイ領域からなるマイクロ配列を形成する方法であって、

(a) 異なる被検体特異アッセイ試薬を含む溶液を(i)違いに離れて同一方向に広がる細長い部材によって形成され、(ii)選択された量の試薬溶液を保持することができ、(iii)毛管流路中の試薬溶液がメニスカスを形成する先端領域を有する、細長い毛管流路を有する試薬分配装置に充填するステップと、

(b) 分配装置の先端を各支持体上の規定位置で複数の支持体各々に対して軽く打ち付け、毛管流路中のメニスカスを壊すように衝撃を与え、選択された量の試薬溶液を支持体上に付着させるステップと、

(c) 異なる被検体特異アッセイ試薬を用いて、ステップ(a)及び(b)を繰り返し、マイクロ配列が形成されるまで、支持体上の異なる規定位置に付着させるステップと、

を備えるマイクロ配列形成方法。

3. 支持体上に核酸ストランドのマイクロ配列を形成する方法であって、マイクロ配列は支持体の1 cm²あたり少なくとも約1000の異なる領域を有し、支持体上に核酸ストランドを付着させるステップを備えた、マイクロ配列形成方法。

4. 支持体上に異なるポリヌクレオチドを備えたマイクロ配列を形成する方法であって、(i)マイクロ配列が、支持体の1 cm²あたり少なくとも約1000の異なる領域を有し、(ii)異なるポリヌクレオチドの各々が、マイクロ配列の離隔した領域に位置し、支持体上に異なるポリヌクレオチドを付着させるステップを備えた、マイクロ配列形成方法。

5. 支持体上に異なるポリヌクレオチドを備えたマイクロ配列を形成する方法であって、(i)マイクロ配列が、支持体の1 cm²あたり少なくとも約1000の異なる領域を有し、(ii)異なるポリヌクレオチドの各々が、マイクロ配列の離隔した領域に位置し、マイクロ配列の離隔した領域に異なるポリヌクレオチドを固定化するステップを備えた、マイクロ配列形成方法。

6. 一つ又は複数の支持体上に被検体特異アッセイ試薬領域からなるマイクロ配列を形成する装置であって、(i)違いに離れて同一方向に広がる細長い部材によって形成され、(ii)被検体特異アッセイ試薬を備えた一定量の溶液を保持することができ、(iii)流路中の溶液がメニスカスを形成する先端領域を有する、開口毛管流路を有する試薬分配装置を備えた、マイクロ配列形成装置。

7. 試薬分配装置が、マイクロ配列の各領域に、約0.002ないし100n1の被検体特異アッセイ試薬を付着させる、請求項6記載のマイクロ配列形成装置。

8. 異なるポリヌクレオチドのマイクロ配列を備えた表面を有する基板であり、(i)マイクロ配列が、基板表面の1 cm²あたり少なくとも約1000の異なるポリヌクレオチド領域を有し、(ii)異なるポリヌクレオチドの各々が、マイクロ配列の離隔した領域に位置する基板。

9. 基板の表面が疎水性である、請求項8記載の基板。

10. 基板がガラスである、請求項8記載の基板。

11. 異なる配列のポリヌクレオチドの混合におけるポリヌクレオチドの量を決定

する方法であり、

(a) ポリヌクレオチドに蛍光検出システムと適合するリポーターで標識することによって、標識ポリヌクレオチドの混合物を形成するステップと、

(b) ハイブリダイゼーション条件下で、標識ポリヌクレオチドの混合物を、 1 cm^2 あたり少なくとも約1000個という密度で基板の表面上の異なる位置に異なる核酸ストランドを備えたマイクロ配列と接触させるステップと、

(c) マイクロ配列の各位置において、蛍光性を検出するステップと、
を備えた決定方法。

12. 第1及び第2のポリヌクレオチド混合物におけるポリヌクレオチドの相対的な量を決定する方法であり、

(a) 第1及び第2の混合物のポリヌクレオチドをそれぞれ第1及び第2のリポーターで標識し、第1の及び第2のリポーターが個別に検出可能でありかつ蛍光性検出システムに適合可能であるステップと、

(b) 標識ポリヌクレオチドの両混合物をハイブリダイゼーション条件下で、異なる核酸ストランドを備えたマイクロ配列と接触させるステップと、

(c) マイクロ配列の各箇所において、第1及び第2のリポーターに関連する蛍光性を検出するステップと、
を備えた方法。

13. 第1及び第2のポリヌクレオチド混合物におけるポリヌクレオチドの相対的な量を決定する方法であり、

(a) 第1及び第2の混合物のポリヌクレオチドをそれぞれ第1及び第2のリポーターで標識し、第1及び第2のリポーターが個別に検出可能でありかつ蛍光性検出システムに適合可能であるステップと、

(b) 標識ポリヌクレオチドの両混合物をハイブリダイゼーション条件下で、 1 cm^2 あたり約1000個という密度で基板の表面上の異なる位置に異なる核酸ストランドを備えたマイクロ配列と接触させるステップと、

(c) マイクロ配列の各位置において、第1及び第2のリポーターと関連する蛍光性を検出するステップと、

を備えた決定方法。

14. ミクロ配列の核酸ストランドがポリヌクレオチドである、請求項11、12、又は13記載の方法。

15. 基板がガラスである、請求項11、12、又は13記載の方法。

16. 第1及び第2の混合物が第1及び第2の細胞タイプから取得される、請求項12又は13記載の方法。

17. 細胞タイプにおける複数の遺伝子の発現の相対的なレベルを決定するために使用し、標識ポリヌクレオチドがかかる細胞タイプのmRNAから取得される、請求項11記載の方法。

18. 第1及び第2の細胞タイプにおける遺伝子の発現の相対的なレベルを決定するために使用し、標識ポリヌクレオチドがかかる第1及び第2の細胞タイプのmRNAから取得される、請求項12又は13記載の方法。

19. 細胞タイプにおける複数の遺伝子の発現の相対的なレベルを決定するために使用し、(i)標識ポリヌクレオチドが、かかる細胞タイプのmRNAから取得され、かつ(ii)核酸ストランドがcDNAである、請求項11記載の方法。

20. 第1及び第2の細胞タイプの遺伝子の発現の相対的なレベルを決定するために使用し、(i)標識ポリヌクレオチドが第1及び第2の細胞タイプのmRNAから取得され、かつ(ii)核酸ストランドがcDNAである、請求項12又は13記載の方法。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/07659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : G01N 33/543, 33/68 US CL : 435/6; 436/518 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 432/57; 435/4, 6, 973; 436/518, 524, 527, 531, 805, 809 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	US, A, 5,338,688 (DEEG ET AL) 16 August 1994, see entire document	1-17
A	US, A, 5,204,268 (MATSUMOTO) 20 April 1993, see entire document.	6-11
A	US, A, 4,071,315 (CHATEAU) 31 January 1978, see entire document.	12-17
A	US, A, 5,100,777 (CHANG) 31 March 1992, see entire document.	12-17
A	US, A, 5,200,312 (OPRANDY) 06 April 1993, see entire document.	12-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 SEPTEMBER 1995		Date of mailing of the international search report 06 OCT 1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer CHRISTOPHER CHIN Telephone No. (703) 308-0196

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(72)発明者 ブラウン, パトリック, オー.
アメリカ合衆国, カルフォルニア州
94305, スタンフォード, ピーター クッ
ツ サークル 76